

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. April 2005 (14.04.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/033316 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/81

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/010346

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. September 2004 (15.09.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 42 794.5 16. September 2003 (16.09.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OSTERMANN, Kai [DE/DE]; Zwickauer Strasse 103, 01187 Dresden (DE). RÖDEL, Gerhard [DE/DE]; Eulenweg 8, 85757 Karlsfeld (DE).

(74) Anwalt: SCHWEIGER, Georg; Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SECRETION OF PROTEINS FROM YEASTS

(54) Bezeichnung: SEKRETION VON PROTEINEN AUS HEFEN

(57) Abstract: The invention relates to expression constructs comprising the coding nucleic acid sequence for a shuttle peptide construct that can be processed by yeast cells. Also disclosed are adequate expression vectors containing such constructs, methods for the recombinant production of target proteins, which are carried out with the aid thereof, hosts transformed therewith, shuttle peptides and nucleic acid sequences coding therefor, nucleic acid sequences that code for such shuttle peptides and are fused with a foreign protein, hydrophobin proteins produced by means of such shuttle peptides, and the use of hydrophobins for coating objects such as leather.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt; entsprechende Expressionsvektoren, enthaltend derartige Konstrukte; mit deren Hilfe durchgeführte Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Zielproteinen; damit transformierte Wirte; Shuttlepeptide und dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen; Nukleinsäuresequenzen kodierend für solche Shuttlepeptide, fusioniert mit einem Fremdprotein; Hydrophobin-Proteine, welche unter Verwendung von derartigen Shuttlepeptiden hergestellt wurden, sowie die Verwendung Hydrophobinen zur Beschichtung von Gegenständen, wie z.B. Leder.



WO 2005/033316 A2

Sekretion von Proteinen aus Hefen

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt; entsprechende Expressionsvektoren, enthaltend derartige Konstrukte; mit deren Hilfe durchgeführte Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Zielproteinen; damit trans-

10 formierte Wirte; Shuttlepeptide und dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen; Nukleinsäuresequenzen kodierend für solche Shuttlepeptide, fusioniert mit einem Fremdprotein; Hydrophobin-Proteine, welche unter Verwendung von derartigen Shuttlepeptiden hergestellt wurden, sowie die Verwendung Hydrophobinen zur Beschichtung von Gegenständen, wie z.B. Leder.

15 Stand der Technik

a) Expression in Hefen

Hefen als Wirt für die heterologe Proteinexpression sind weit verbreitet. Grund dafür

20 ist, dass Hefen als Expressionssystem mehrere Vorteile besitzen. Im Vergleich zu Bakterien und anderen eukaryotischen Zellen können sie nämlich in höherer Dichte wachsen und sie besitzen die Fähigkeit zur Proteinglykosilierung und post-translationalen Modifikation. Außerdem können die von Hefen produzierten und sezernierten Produkte deshalb in einfacher Weise gereinigt werden, weil die Hefen hohe Resistenz gegen

25 Zelllyse besitzen, und im Wachstumsmedium gewöhnlich geringe Mengen an Fremdprotein zu finden sind. Darüber hinaus können Hefen schneller als andere eukaryotische Zellen in hoher Dichte auf kostengünstigen Nährmedien wachsen.

Im Stand der Technik gibt es zahlreiche verschiedene Ansätze zur Expression und

30 Sekretion heterologer Proteine in Hefen. So wird beispielsweise in der US 5,642,487 ein Verfahren zur rekombinanten Produktion von Proteinen in Hefen beschrieben, wobei man Hefe mit einer Expressionskassette transformiert, welche für ein Strukturelement kodiert, das eine Leadersequenz aus einem tierischen Peptidneurohormon, eine Adaptor-Sequenz, produzierend eine α -Helixstruktur, ein Prozessierungssignal sowie

35 ein Strukturgen kodiert.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. April 2005 (14.04.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/033316 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/81,
15/62

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/010346

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. September 2004 (15.09.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 42 794.5 16. September 2003 (16.09.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OSTERMANN, Kai
[DE/DE]; Zwickauer Strasse 103, 01187 Dresden (DE).
RÖDEL, Gerhard [DE/DE]; Eulenweg 8, 85757 Karls-
feld (DE).

(74) Anwalt: SCHWEIGER, Georg; Reitstötter, Kinzebach &
Partner (GbR), Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 6. Oktober 2005

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SECRETION OF PROTEINS FROM YEASTS

(54) Bezeichnung: SEKRETION VON PROTEINEN AUS HEFEN

(57) Abstract: The invention relates to expression constructs comprising the coding nucleic acid sequence for a shuttle peptide construct that can be processed by yeast cells. Also disclosed are adequate expression vectors containing such constructs, methods for the recombinant production of target proteins, which are carried out with the aid thereof, hosts transformed therewith, shuttle peptides and nucleic acid sequences coding therefor, nucleic acid sequences that code for such shuttle peptides and are fused with a foreign protein, hydrophobin proteins produced by means of such shuttle peptides, and the use of hydrophobins for coating objects such as leather.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, umfassend die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein von Hefezellen prozessierbares Shuttlepeptidkonstrukt; entsprechende Expressionsvektoren, enthaltend derartige Konstrukte; mit deren Hilfe durchgeführte Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Zielproteinen; damit transformierte Wirte; Shuttlepeptide und dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen; Nukleinsäuresequenzen kodierend für solche Shuttlepeptide, fusioniert mit einem Fremdprotein; Hydrophobin-Proteine, welche unter Verwendung von derartigen Shuttlepeptiden hergestellt wurden, sowie die Verwendung Hydrophobinen zur Beschichtung von Gegenständen, wie z.B. Leder.

WO 2005/033316 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/010346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/81 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IMAI Y ET AL: "THE FISSION YEAST MATING PHEROMONE P-FACTOR: ITS MOLECULAR STRUCTURE, GENE STRUCTURE, AND ABILITY TO INDUCE GENE EXPRESSION AND G1 ARREST IN THE MATING PARTNER" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR, NY, US, vol. 8, no. 3, 1994, pages 328-338, XP001120726 ISSN: 0890-9369 the whole document	1-24
X	WO 02/46369 A (SEPTEGEN LIMITED; DAVEY, JOHN) 13 June 2002 (2002-06-13) SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:27 page 17; figure 7A	1-5,8,9, 12-20, 23,24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

20 July 2005

Date of mailing of the International search report

29. 07. 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, A